植物菌根块菌分子鉴定及菌丝培养基优化的研究

樊莉娟[1]，张国珍[2]，张冰冰[1]，徐莺[1]，秦小波[1,2*]

（1. 四川大学 生命科学学院，生物资源与生态环境教育部重点实验室，成都 610065；2. 四川省自然资源科学研究院，成都 610015）

摘要：块菌属（*Tuber*）是由真菌感染其适宜植物根系形成，部分块菌如法国黑孢块菌(*T. melanosporum*)和中国印度块菌(*T. indicum*)等为珍稀药食两用菌，具有很高的经济价值。对块菌的过度挖掘造成野生块菌资源匮乏，块菌人工栽培技术则是实现块菌产业可持续性发展的重要基础。目前国内外人工栽培主要采用块菌子实体匀浆制成的子囊孢子悬浮液，与人工种植苗木根系共生。利用块菌菌丝替代子实体孢子悬浮液进行接种，具有减少对块菌子实体的依赖性和生产成本、保护林下块菌野生资源、促进块菌人工繁育进程的积极意义，但需要成熟高效的菌丝培养技术。因此该研究从云南、陕西等地林下采取块菌样品，在 ITS 分子鉴定并纯化得到纯种菌丝的基础上，以菌丝直径为指标，经单因素实验和 4 因素 3 水平正交实验 L9(3^4)，筛选得出最适宜的菌丝生长培养基。结果表明：(1)形态和 ITS 分子鉴定得到的 13 份块菌样品分属印度块菌(*T. indicum*)和假凹陷块菌(*T. pseudoexcavatum*)两种。(2)纯化的印度块菌菌丝培养基的最佳碳源为马铃薯浸出液，最佳氮源为酵母膏，VB1 对印度块菌菌丝生长并无显著性促进作用。(3)最佳的碳源、氮源、无机盐组合为马铃薯浸出液 150 g·L^{-1}，酵母膏 3 g·L^{-1}，$MgSO_4$ 2 g·L^{-1}，KH_2PO_4 2 g·L^{-1}。25 ℃，自然 pH 下培养 8 d 菌落直径可达 49.44 mm。

关键词：块菌属，ITS，菌丝，固体培养基，优化

Study on molecular identification and optimization of mycelium culture medium in plant mycorrhizal tubers

FAN Lijuan[1], ZHANG Guozhen[2], ZHANG Bingbing[1], XU Ying[1], QIN Xiaobo[1,2*]

(1. *Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University*, Chengdu 610065, China; 2. *Sichuan Natural Resources Institute*, Chengdu 610015, China)

Abstract: *Tuber* is a type of fungus underground, formed by infecting suitable plant roots. And some species such as *T. melanosporum* and *T. indicum* are rare and valuable for both medicine and food. The over excavation of *Tuber* has caused a shortage of wild *Tuber* resources, and the artificial cultivation technology of *Tuber* is an important foundation for the sustainable development of the *Tuber* industry. At present, the ascosporic suspension made from the homogenate of the fruiting body, is mainly used in the artificial cultivation, which is symbiotic with the roots of the planting seedlings. It is valuable for reducing the dependence on the fruiting body of *Tuber* and the production cost, protecting the wild resources of *Tuber* under the forest and promoting the process of artificial propagation of *Tuber*, to use the mycelium of *Tuber* instead of the spore suspension for inoculation, but it needs mature and efficient technology for mycelium culture. Therefore, *Tuber* samples were taken from the forests of Yunnan, Shaanxi and other places. Then, ITS sequence analysis was carried out to identify species and purify hyphaes. The most suitable mycelium growth medium was selected by the L9(3^4) orthogonal test (four factors

---

基金项目：国家自然科学基金（31400288）；四川省青年科学技术基金（2015JQO052）；四川省科技计划项目（2018NZ0091，20ZDYF3370，20ZDYF3300）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400288); Sichuan Youth Science and Technology Foundation (2015JQO052); Science and Technology Program of Sichuan Province (2018NZ0091, 20ZDYF3370, 20ZDYF3300)]。

作者简介：樊莉娟（1994-），女，四川南充人，硕士研究生，主要从事野生动植物保护与资源利用研究，（E-mail）369930750@qq.com。

[*]**通信作者：**秦小波，博士，副研究员，主要从事植物与微生物资源开发研究，（E-mail）qxb_2003@163. com。

with three levels), using the mycelium diameter as an index. The results were as follows: (1) The 13 *Tuber* samples identified by morphological and ITS molecular identification belonged to *T. indicum* and *T. pseudoexcavatum*. (2) The optimum carbon source for *T. indicum* mycelium was potato extract, and the optimum nitrogen source was yeast extract. However, VB1 had no significant promotion effect on the mycelial growth of *T. indicum*. (3) The optimal combination of carbon, nitrogen and inorganic salts was potato extract 150 g Ł$^{-1}$, yeast extract 3 g Ł$^{-1}$, $MgSO_4$ 2 g Ł$^{-1}$, and KH_2PO_4 2 g Ł$^{-1}$. The diameter of colony can reach 49. 44 mm, which is cultured at 25 ℃ and natural pH for 8 days.

Key words: *Tuber*, ITS, hyphae, solid medium, optimization

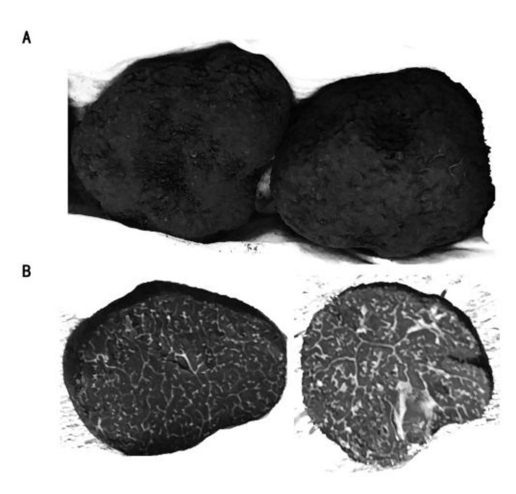
块菌属（*Tuber*）是由土壤真菌感染其共生的植物根系形成(王曙光和林先贵，2001）。全世界已知块菌种类超过 180 种，主要分布在法国、意大利（Bonito et al., 2010）以及中国的四川、云南、新疆、西藏等地（张介平和刘培贵，2015）。块菌富含蛋白质、维生素、氨基酸和矿物质等营养物质，风味独特（陶恺和刘波，1990），其含有的α-雄烷醇、块菌多糖具有提升免疫力、抗肿瘤与抗氧化等重要功效（曹晋忠等，2011），价格昂贵，异常珍稀，是重要的经济真菌（邓晓娟等，2019）。

近年来由于开发过度，野生块菌产量显著减少，开展其人工栽培是其必然趋势。目前国内外主要采用块菌子实体匀浆制成的子囊孢子悬浮液，接种于适宜的人工种植宿主苗木根系共生，模拟野生生长环境来进行半人工栽培。但是，子实体中的害虫和病原体以及其他菌根真菌会污染植物根系，影响块菌菌根形成。并且每株植物根系均接种多个孢子，且子囊孢子是有性孢子，因此其菌根成分可能互不相同，难以适应特定的土壤和气候条件（Iotti et al., 2016）。特别是由于块菌本身价值就很高，造成子实体匀浆接种成本也高，存在过程繁琐、周期长、产量低、对自然环境条件依赖严重等问题（胡炳福等，2010）。最近，Iottiet al.（2016）报道将勃氏块菌的纯培养菌丝代替子实体匀浆孢子悬浮液，接种于宿主苗木获得菌根，并成功产生子实体。该技术不仅降低了其根系污染的风险，而且极大地节约了生产成本。印度块菌作为中国主要商业块菌，采用印度块菌菌丝接种而获得菌根及子实体的案例，目前尚未有报道。因此，本研究从块菌的分子鉴定处着手，通过筛选优良的印度块菌母种菌丝培养基，获得优良菌丝，旨在为后续的印度块菌菌丝接种植物根系，获得菌根和子实体提供理论依据和支持，对降低成本，加快其人工栽培进程具有重要价值，还促进了林下块菌菌根的资源保护。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从陕西、云南等地林下采取块菌子实体，见图 1。宿主苗木见表 1，经初步形态鉴定后组织分离培养获得纯种菌丝。



A.子实体整体图；**B**. 子实体切面图。

A. Fruiting body overall picture; **B**. Fruiting body cutaway picture.

图 1 部分块菌子实体图片

Fig. 1 Some truffle fruiting body pictures

1. 2 方法

1. 2. 1 菌丝分离纯化

以 PDA 为纯化培养基，采用组织分离法进行（周建平等，2017）。

1. 2. 2 基于 rDNA ITS 序列的分子鉴定

（1）样品 DNA 提取及 rDNA ITS 序列扩增

采用植物 DNA 提取试剂盒（天根生化北京有限公司）提取块菌子实体组织 DNA。采用真菌 ITS 序列通用引物 ITS1（5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’）和 ITS4（5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’）对样品 rDNA ITS 序列进行扩增。PCR 体系：2×primestar Mix 高保真酶 25 μL、模板 2 μL、引物各 2 μL、ddH$_2$O 19 μL。扩增程序：98 ℃预变性 2 min，35 个循环（98 ℃变性 30 s，55 ℃退火 10 s，72 ℃延伸 10 s），72 ℃再延伸 2 min，12 ℃保存。1%琼脂糖凝胶电泳检测条带大小，凝胶回收目的条带。

（2）目的条带的载体构建、测序及序列比对分析

采用 T4 Quick Blunt 试剂盒（诺唯赞生物科技有限公司）连接目的条带至 T4 载体中，由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将所测 ITS 序列利用 BLAST 程序与 NCBI 中的核酸数据库进行同源性比对，以相似性比对得分最高的参考序列确定所测样品的物种。

1. 2. 3 单因素试验

碳源筛选：分别以葡萄糖 20 g·L^{-1}、马铃薯 200 g·L^{-1}、蔗糖 20 g·L^{-1}、麦芽糖 20 g·L^{-1} 作为碳源。其他成分：2 g·L^{-1} 蛋白胨，1 g·L^{-1} KH$_2$PO$_4$，1 g·L^{-1} MgSO4，0.05 g·L^{-1} VB1，琼脂粉 20 g·L^{-1}。

氮源筛选：分别以蛋白胨 2 g·L^{-1}、酵母膏 2 g·L^{-1}、牛肉膏 2 g·L^{-1}、氯化铵 2 g·L^{-1}、硝酸铵 2 g·L^{-1} 作为氮源。其他成分：20 g·L^{-1} 葡萄糖，1 g·L^{-1} KH$_2$PO$_4$，1 g·L^{-1}MgSO$_4$，0.05 g·L^{-1} VB1，琼脂粉 20 g·L^{-1}。

VB1 筛选：将 VB1 作为变量，分别设置空白对照组与 VB1 组，其他成分：20 g·L^{-1} 葡萄糖，2 g·L^{-1} 蛋白胨，1 g·L^{-1} KH$_2$PO$_4$，1 g·L^{-1}MgSO$_4$，0.05 g·L^{-1} VB1，琼脂粉 20 g·L^{-1}。

各设置 3 个重复，自然 pH，置于 25 ℃培养(马欣燕等，2016)，7 d 后统计菌丝生长直径。数据统计及显著性分析采用 GraphPad Prism 5 软件及 SPASS 22. 0 软件的 ANOVA 方法完成。

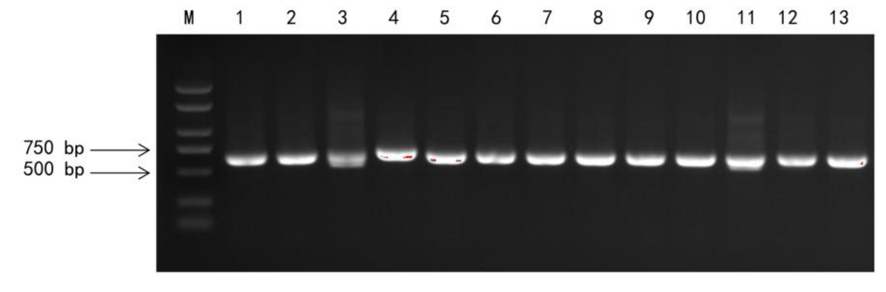
1. 2. 4 正交试验

将单因素试验筛选出的最佳因子，结合前人研究表明对食用菌菌丝有促进作用的 MgSO$_4$ 及 KH$_2$PO$_4$ 两个因素（马欣燕等，2016；何明霞等，2009）进行正交试验，以筛选各因素的最佳组合，各设置 4 个重复，培养条件同上。正交试验极差分析采用 Minitab 17 软件完成。

2 结果与分析

2. 1 基于 ITS 序列分子鉴定

以子实体提取的 DNA 为模板，采取真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增，13 个样品均扩增出清晰条带，大小约 600 bp（图 2）。将样品序列在 NCBI 核酸数据库中进行比对，共匹配出 3 种块菌：印度块菌（*Tuber indicum*）、假凹陷块菌（*T. pseudoexcavatum*）和中国块菌（*T. sinense*）（表 1）。由于目前中国块菌和印度块菌已被鉴定为同种（Chen et al., 2011），故本次调查获得的块菌实际只有 2 个种。



M. Marker DL2000，**1-13**. 13 个块菌样品的 PCR 扩增产物。

M. Marker DL2000, **1-13**. PCR amplification products of 13 truffle samples.

图 2 13 个块菌样品的 ITS 扩增

Fig. 2 ITS amplification of 13 truffle samples

表 1　ITS 序列比对及种属鉴定

Table 1 ITS sequence alignment, genera and species identification

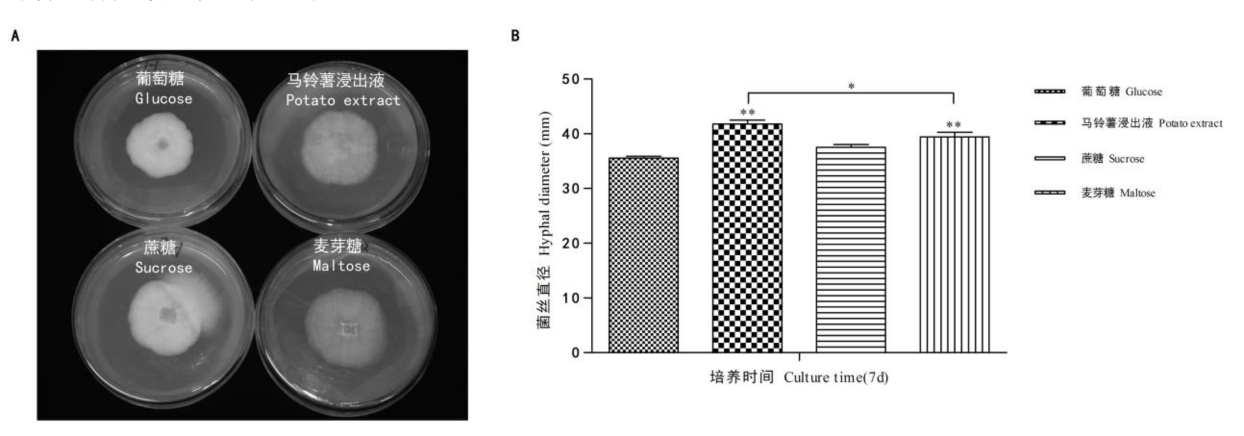
样品 Sample	宿主 Host	长度 Length (bp)	最大相似序列 ID Maximum similar sequence ID	序列同源性 Sequence homology	种属分类 Species classification
1	云南松 *Pinus yunnanensis*	620	DQ375526. 1	99%	中国块菌 *Tuber sinense*
2	云南松 *P. yunnanensis*	654	GU979039. 1	99%	假凹陷块菌 *T. pseudoexcavatum*
3	马尾松 *P. massoniana*	620	GU979080. 1	99%	印度块菌 *T. indicum*
4	云南松 *P. yunnanensis*	620	DQ375526. 1	99%	中国块菌 *T. sinense*
5	马尾松 *P. massoniana*	620	GU979076. 1	100%	印度块菌 *T. indicum*
6	华山松 *P. armandii*	620	U89362. 1	100%	印度块菌 *T. indicum*
7	青冈栎 *Cyclobalanopsis glauca*	620	GU979076. 1	100%	印度块菌 *T. indicum*
8	华山松 *Pinus armandii*	620	U89362. 1	100%	印度块菌 *T. indicum*
9	槲栎 *Quercus aliena*	620	GU979080. 1	100%	印度块菌 *T. indicum*
10	马尾松 *Pinus massoniana*	620	GU979076. 1	99%	印度块菌 *T. indicum*
11	青冈栎 *Cyclobalanopsis glauca*	620	U89362. 1	100%	印度块菌 *T. indicum*
12	青冈栎 *C. glauca*	628	GU979080. 1	100%	印度块菌 *T. indicum*
13	槲栎 *Quercus aliena*	620	GU979076. 1	99%	印度块菌 *T.indicum*

2. 2 块菌菌丝分离

菌丝提取 DNA 后，进行 ITS 序列鉴定比对后确定为印度块菌。

2. 3 单因素试验不同碳源对印度块菌菌丝生长的影响

以菌落直径为衡量指标，判断不同碳源对印度块菌菌丝生长的影响（图 3）。发现 4 种碳源均能较好地被印度块菌所利用，但马铃薯浸出液培养基和麦芽糖培养基上的菌落直径明显大于葡萄糖与蔗糖培养基（图 3：A）。其中，马铃薯浸出液组、麦芽糖组与葡萄糖组在 α=0. 01 水平上具有极显著差异；马铃薯浸出液组与麦芽糖组在 α=0. 05 水平上也具有显著性差异，故马铃薯浸出液为本试验中块菌最佳碳源，采用马铃薯进行后续正交试验（图 3：B）。



A. 4 种碳源培养基中印度块菌菌丝；**B**. 4 种碳源培养基中印度块菌菌落直径。*. 在 α=0. 05 水平有显著性差异，**. 在 α=0. 01 水平有极显著差异，下同。

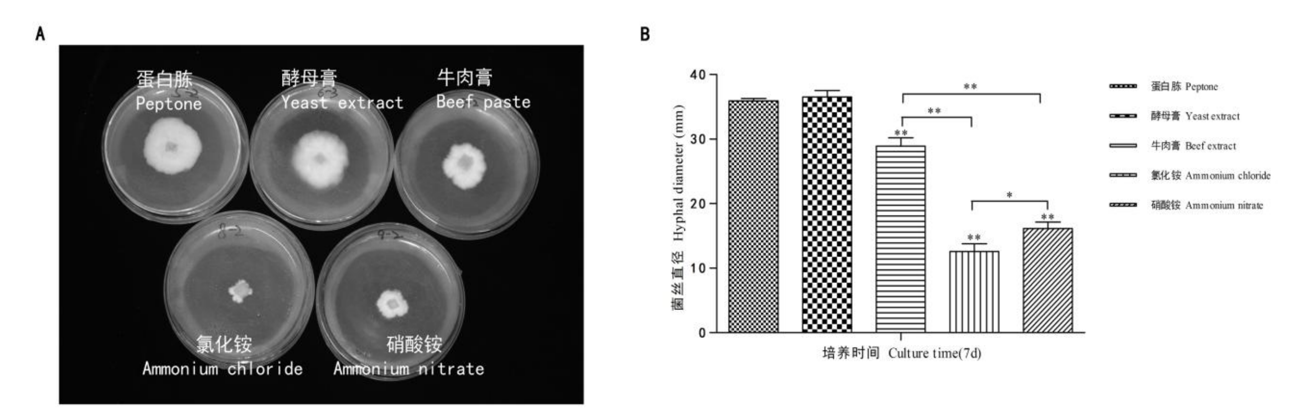
A. Hyphae of *Tuber indicum* in 4 types carbon medium; **B**. Hyphae diameter of *T. indicum* in 4 types carbon medium. *. Significant difference in α=0. 05 level, **. Extremely significant difference in α=0. 01 level, the same below.

图 3 4 种碳源培养基中印度块菌菌丝

Fig. 3 Hyphal of *Tuber indicum* in 4 carbon medium

2. 4 单因素试验不同氮源对印度块菌菌丝生长的影响

食用菌对无机氮源和有机氮源均能进行吸收利用，部分食用菌对无机氮源利用率更高（牛玉蓉等，2013），故本次以菌落直径为衡量指标，以蛋白胨为对照，对两类氮源均进行了试验（图 4）。有机氮源和无机氮源对菌落直径的影响在 α=0. 01 水平上极显著差异，前者的效果明显好于后者，但牛肉膏的效果要逊于蛋白胨和酵母膏。在无机氮源中，硝酸铵的效果要优于氯化铵，在 α=0. 05 水平上显著差异。故总体来看，印度块菌对 5 种氮源的吸收利用率为酵母膏>蛋白胨>牛肉膏>硝酸铵>氯化铵，采用酵母膏进行后续正交试验。



A. 5 种氮源培养基中印度块菌菌丝；**B**. 5 种氮源培养基中印度块菌菌落直径。

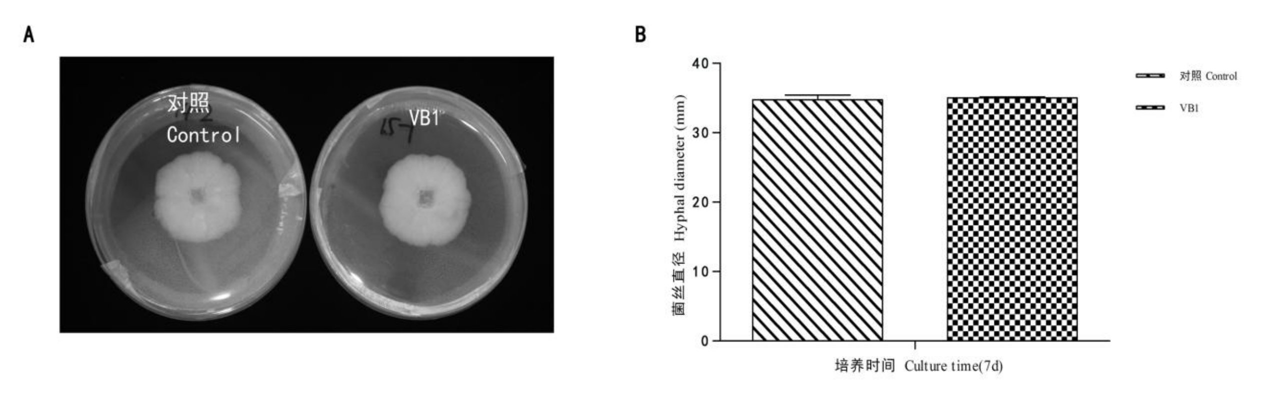
A. Hyphae of *Tuber indicum* in 5 types nitrogen medium; **B**. Hyphae diameter of *Tuber indicum* in 5 types nitrogen medium.

图 4 5 种氮源培养基中印度块菌菌丝

Fig. 4 Hyphal of *Tuber indicum* in 5 nitrogen medium

2. 5 VB1 对印度块菌菌丝生长的影响

前人研究证明，VB1 对某些食用菌如鸡枞菌丝、草原白蘑菌丝等生长有促进作用（王小丹等，2011；马荣山和方蕊，2011）。但是在本试验中，VB1 对块菌的生长并无显著性促进作用（图 5）。因此，从实际生产利用的成本出发，在培养母种菌丝时，未将 VB1 纳入后续正交试验。



A. 印度块菌在对照组和 VB1 培养基中菌丝；**B**. 印度块菌在对照组和 VB1 培养基中菌落直径。

A. Hyphae of *Tuber indicum* in control group and medium; **B**. Hyphae diameter of *Tuber indicum* in control group and VB1 medium.

图 5 空白组与 VB1 培养基中的印度块菌菌丝

Fig. 5 Hyphal diameter of *Tuber indicum* in control and VB1 medium

2. 6 正交试验筛选最佳培养基

将单因素试验所得的最佳碳源、最佳氮源、以及前人研究所得的 $MgSO_4$ 及 KH_2PO_4 按 L_9（3^4）4 因素 3 水平设计正交试验，复选优化印度块菌菌丝生长的固体培养基（表 2）。极差 *R* 的大小代表各个因素在不同水平时对菌丝直径影响程度的大小，其中极差 *R* 越大，则此因素在不同水平对菌丝直径的影响就越大（Gregory et al., 2013），故碳源马铃薯浸出液对印度块菌菌丝生长直径影响最大，$MgSO_4$ 次之，再次为酵母膏，最后为 KH_2PO_4。k 值代表同一因素不同水平对菌落直径的影响，其中 *k* 值较大者代表此水平对菌落直径有较好的促进作用(陈文强等，2005)，因此本研究中的印度块菌菌丝生长的最佳培养条件为 $A_1B_3C_3D_3$，即马铃薯浸出液 150 g L^{-1}、酵母膏 3 g L^{-1}、$MgSO_4$ 2 g L^{-1}、KH_2PO_4 2 g L^{-1}。

表 2 L_9（3^4）正交试验结果

Table 2 L_9 (3^4) results of orthogonal test

试验号 Test number	因素 Factor					
	马铃薯浸出液 Potato extract (A)	酵母膏 Yeast extract (B)	$MgSO_4$ (C)	KH_2PO_4 (D)	水平组合 Horizontal combination	菌落直径 Hyphae diameter (mm)
1	150	2	1	1	$A_1B_1C_1D_1$	48. 75

2	150	2. 5	1. 5	1. 5	$A_1B_2C_2D_2$	47. 81
3	150	3	2	2	$A_1B_3C_3D_3$	49. 44
4	200	2	1. 5	2	$A_2B_1C_2D_3$	46. 37
5	200	2. 5	2	1	$A_2B_2C_3D_1$	46. 94
6	200	3	1	1. 5	$A_2B_3C_1D_2$	47. 00
7	250	2	2	1. 5	$A_3B_1C_3D_2$	47. 25
8	250	2. 5	1	2	$A_3B_2C_1D_3$	46. 69
9	250	3	1.5	1	A $B_3C_2D_1$	46. 62
*k*1	48.67	47.46	47.48	47.44		
*k*2	46.77	47.15	46.93	47.35		
*k*3	46.85	47.69	47.88	47.50		
极差 Range (*R*)	1.90	0. 54	0.94	0.15		

3 讨论

块菌营养物质丰富，但因资源稀缺、采摘难度大等多种因素，造成其价格极昂贵，人工培育将成为其必然发展趋势（郭尚等，2014）。块菌菌丝对比子实体匀浆孢子悬浮液，具有易获得、易保存、纯化程度高、成本低等优点。本研究获得了印度块菌菌丝最适宜母种培养基，该结果不仅促进了印度块菌的人工培育进程，而且能促进林下块菌菌根的资源保护。

在多数食用菌碳源筛选中，最佳碳源多为葡萄糖、蔗糖以及麦芽糖等（何明霞等，2009；陈文强等，2002；徐瑞雅等，2007）。葡萄糖是多数食用菌良好同化利用的碳源，但并非是所有食用菌最好的碳源。马铃薯浸出液的主要成分为淀粉物质，据报道，葡萄糖经高温灭菌后还原糖含量降低，而可溶性淀粉经高温灭菌处理后产生复杂变化，还原糖含量升高，更容易被一些食用菌菌丝吸收利用，例如香菇、柳松茸在高温灭菌的可溶性淀粉为唯一碳源的培养基中生长最块，蛹虫草在间歇灭菌的可溶性淀粉为唯一碳源的培养基中生长最块（何培新等，2003）。本研究中，印度块菌培养基的最适碳源为马铃薯浸出液，可能是印度块菌丝能产生高活性的淀粉酶，能快速分解淀粉。另外据报道，马铃薯含有多种营养物质、酶类、生理活性物质以及矿物质等微量元素（吕巨智等，2009；丁红瑾，2013），具有丰富的营养价值。邓晓娟等（2019）在印度块菌子囊果内细菌的群落结构研究中，发现其细菌物种丰富，群落结构复杂，包括 4 属 40 种，其中变形菌门、拟杆菌门和放线菌门的物种占总物种数的 99.7%，是其优势细菌。其中放线菌门产生的多种酶类，变形菌门的固氮细菌有效固氮，多种细菌产生的复杂影响有利于其印度块菌的菌丝生长和子囊果的形成(Streiblov áet al., 2012)。马铃薯作为印度块菌的最适碳源，可能是马铃薯浸出液中的有关酶类等生物活性物质，以及矿物质等微量元素弥补了块菌子囊果中细菌产生的有效活性物质，从而促进印度块菌菌丝的生长。最后，块菌菌根是与其适宜苗木的根系共生而形成，马铃薯块根作为一种变态根系，其中可能含有与块菌共生苗木根系的类似成分，而促进块菌菌丝的生长，这暗示也许可从植物的根中分离出可促进块菌菌丝生长的物质，我们将在以后的工作中进行实验探索和验证。

本研究另一个结果表明，VB1 对印度块菌的菌丝生长并无促进作用，相反，VB1 对某些食用菌如鸡枞菌丝、草原白蘑菌丝等生长则有促进作用（王小丹等，2011；马荣山和方蕊，2011）。目前块菌尚无相关研究涉及维生素的应用机理，猜测可能是印度块菌长期与宿主植物根系共生，多种细菌影响子囊果的生态适应性，使得形成无需 VB1 的独特性质，但具体的机理等还需进一步研究。

综合本研究结果，最后得出印度块菌优化母种培养基配方为：马铃薯浸出液 150 g·L^{-1}、酵母膏 3 g·L^{-1}、$MgSO_4$ 2 g·L^{-1}、KH_2PO_4 2 g·L^{-1}，在 25 ℃下培养 8 d 后可使菌落直接达 49. 44 mm。本研究为印度块菌利用菌丝代替子实体匀浆孢子悬浮液接种于宿主根系产生子实体提供了研究基础，可解决子实体匀浆孢子悬浮液的高成本、过程繁琐以及子实体匀浆孢子中其他真菌污染植物根系等问题。同时，优化固体培养基上长出的印度块菌菌丝如何运用于后续的人工接种及栽培还需进一步研究。

参考文献：

BONITO GM, GRYGANSKYI AP, TRAPPE JM, et al., 2010. A global meta-analysis of Tuber ITS rDNA sequences: Species diversity, host association and long-distance dispersal [J]. Mol Ecol, 19(22): 4994-5008.

CAO JZ, WEI L, SU H, et al., 2011. Study on extraction and anti-oxidant activity of crude polvsaccharides from *Tuher indicum*[J]. J Shanxi Univ (Nat Sci Ed), 34 (1): 137-142. [曹晋忠，魏磊，苏红，等，2011. 印度块菌

粗多糖的提取及抗氧化活性研究[J]. 山西大学学报(自然科学版)，34(1): 137-142.]
CHEN J, GUO SX, LIU PG, 2011. Species recognition and cryptic species in the *Tuber indicum* complex[J]. PLoS ONE, 6(1): e14625.
CHEN WQ, DENG BW, CHEN YG, et al., 2005. Selection of liquid medium for schinophyllum commune by L9 (3~4) orthogonal design[J]. J Food Sci Biotechnol, 24 (4): 38-41. [陈文强，邓百万，陈永刚，等，2005. 用L9(3~4)正交试验筛选裂褶菌液体培养基[J]. 食品与生物技术学报，24(4): 38-41.]
CHEN WQ, ZHOU XW, DENG BW, 2002. A preliminary study on the selection of mother culture media of agaricus blazei Mürrill[J]. Acta Edul Fung, 9(2): 31-34. [陈文强，周选围，邓百万，2002. 姬松茸母种培养基筛选研究初报[J]. 食用菌学报，9(2): 31-34.]
DENG XJ, LIU JL, YAN XF, et al., 2019. Community composition of bacteria associated with ascocarps of *Tuber indicum* using traditional culture method and roche 454 high-throughput sequencing[J]. Biodivers Sci, 26(12): 1318-1324. [邓晓娟，刘建利，闫兴富，等，2019. 用传统分离培养法和高通量测序技术分析印度块菌子囊果内细菌的群落结构[J]. 生物多样性，26(12): 1318-1324.]
DING HJ, 2013. Effects of calcium treatment on main components and physiological and biochemical indexes of potato during storage[D]. Yinchuan: Ningxia University. [丁红瑾，2013. 钙处理对贮藏期马铃薯主要成分及生理生化指标的影响[D]. 银川：宁夏大学.]
GREGORY B, SMITH M E, MICHAEL N, et al., 2013. Historical biogeography and diversification of truffles in the *Tuberaceae* and their newly identified southern hemisphere sister lineage[J]. PLoS ONE, 8(1): e52765.
GUO S, LI Y, ZHAO ZL, et al., 2014. Research status, problems and prospects of truffles [J]. Edib Fung, 6(1) : 4-6. [郭尚，李渊，赵照林，等，2014. 块菌的研究现状、问题及展望[J]. 食用菌，6(1): 4-6.]
HE MX, ZHANG CX, JI KP, et al., 2009. Screening of carbon and nitrogen sources and inorganic salts mycelium culture medium of phlebopusportentosus[J]. J Yunnan Agric Univ (Nat Sci Ed), 24(5): 145-149. [何明霞，张春霞，纪开萍，等，2009. 暗褐网柄牛肝菌菌丝体培养基的碳源、氮源及无机盐的筛选研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版)，24(5): 145-149.]
HE PX, XU Y, ZHANG CK, 2003. A Study on Assimilation of Glucose and Soluble Starch of 8 mushrooms[J].J Henan Inst Sci Technol(Nat Sci Ed), 31(3): 28-30. [何培新，徐燕，张长铠, 2003. 8 种食用菌同化利用葡萄糖和可溶性淀粉的探讨[J]. 河南科技学院学报（自然科学版），31(3): 28-30.]
HU BF, YUAN XM, YU JY, et al., 2010. Successful introduced cultivation of *Tuber indicum* in Guizhou[J]. For By-Prod Spec China, (2): 1. [胡炳福，远香美，余金勇，等，2010.印度块菌栽培在贵州首获成功[J].中国林副特产，(2): 1.]
IOTTI M, PIATTONI F, LEONARDI P, et al., 2016. First evidence for truffle production from plants inoculated with mycelial pure cultures[J]. Mycorrhiza, 26(7): 793-798.
LÜ JZ, RAN H, JIANG JC, et al., 2009. Nutrients and Health Value of Potato[J]. Food Nutr Chin, (3): 53-54. [吕巨智，染和，姜建初，2009.马铃薯的营养成分及保健价值[J]. 中国食物与营养，(3): 53-54.]
MA RS, FANG R, 2011. Isolation of *Tricholoma mongolicum* and test of mycelium growth[J]. J Shenyang Agric Univ, 42(1): 69-73. [马荣山，方蕊，2011. 草原白蘑菌种分离及菌丝体生长因子的筛选[J]. 沈阳农业大学学报，42(1): 69-73.]
MA XY, WANG GZ, GUO CJ, 2016. Screening of *Tuber indicum* liquid medium by orthogonal design[J]. Jiangsu Agric Sci, 44(3): 200-203. [马欣燕，王国正，郭成金，2016. 正交试验设计法筛选印度块菌液体培养基[J]. 江苏农业科学，44(3): 200-203.]
NIU YR, WANG MH, ZHANG GQ, et al., 2013. ITS sequence analysis of strain obtained from wild *Suillus granulatus* fruit bodies and opitimization of selected parameters[J]. Acta Edul Fung, 20(4): 6-10. [牛玉蓉，王明花，张国庆，等，2013. 点柄粘盖牛肝菌菌种分子鉴定与最适培养条件研究[J]. 食用菌学报，20(4): 6-10.]
STREIBLOVÁ E, GRYNDLEROVÁ H, GRYNDLER M, 2012. Truffle brûlé An efficient fungal life strategy[J]. Fems Microbiol Ecol, 80(1): 1-8.
TAO K, LIU B, 1990. Ecological and nutritional value of *Tuber sinense*[J]. J Shanxi Univ (Nat Sci Ed), 13(3):

319-321. [陶恺，刘波，1990. 中国块菌的生态和营养价值[J]. 山西大学学报(自然科学版)，13(3): 319-321.]

TEDERSOO L, MAY TW, SMITH ME, 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages[J]. Mycorrhiza, 20(4): 217-263.

WANG SG, LIN XG, 2001. Effect of mycorrhiza on bioremediation of polluted soil[J]. Rural Eco-Environ, 17(1): 56-59. [王曙光，林先贵，2001. 菌根在污染土壤生物修复中的作用[J]. 生态与农村环境学报，17(1): 56-59.]

WANG XD, LIU Q, CAI H, et al., 2011. A study on the solid culture of termitomyces *Albuminosus mycelium*[J]. J Neijiang Norm Univ, 25(2): 460-461. [王小丹，刘强，蔡虹，等，2011. 鸡枞菌丝的固体培养研究[J]. 内江师范学院学报，25(2): 460-461.]

XU RY, QI ZG, JIA NB, et al., 2007. Study on the best stock culture media of three kinds of mushrooms[J]. J Hebei Agric Sci, 11(1): 23-24. [徐瑞雅，齐志广，贾耐兵，等，2007. 食用菌最佳母种培养基的筛选[J]. 河北农业科学，11(1): 23-24.]

ZHANG JP, LIU PG, 2015. Ecological features associated with *Tuber sinoaestivum*[J]. Acta Edul Fung, 22(1): 34-40. [张介平，刘培贵，2015. 中华夏块菌及其生态学研究[J]. 食用菌学报，22(1): 34-40.]

ZHOU JP, CHEN J, XU D, et al., 2017. Mycelium isolation and species identification of Panzhihua truffle[J]. J Panzhihua Univ, 34(2): 1-5. [周建平，程君，徐德，等，2017. 攀枝花块菌菌丝体的分离及种属鉴定[J]. 攀枝花学院学报，34(2): 1-5.]